Aus dem II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow

---

# Über die alleräußerste Zellmembran des Froschhautepithels

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

1968

vorgelegt von

Ulrich Thorns

Dekan: Prof. Dr. Loew

Referenten: Prof. Dr. Passow
Prof. Dr. Rummel

Aus dem II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow

---

# Über die alleräußerste Zellmembran des Froschhautepithels

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

1968

vorgelegt von

Ulrich Thorns

Dekan: Prof. Dr. Loew

Referenten: Prof. Dr. Passow
Prof. Dr. Rummel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 11. Juli 1968 abgelegt.

## Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| Einleitung | | 1 |
| Methodik | | 6 |
| Ergebnisse | I. Supravitalfärbung | 16 |
| | II. Die Potentialdifferenz über der alleräußersten Zellmembran | 16 |
| | III. Der Widerstand der alleräußersten Zellmembran | 17 |
| | IV. Die Lokalisation der schnellen Potentialschwankung | 17 |
| | V. Die Wirkung von Digitonin | 19 |
| | VI. Der Einfluß von Amphotericin B | 21 |
| Diskussion | I. Morphologie | 25 |
| | II. Wo entsteht der Spike ? | 31 |
| | III. Der Widerstandsabfall nach Digitonin | 4o |
| | IV. Die schnelle Potentialschwankung unter Amphotericin B | 46 |
| Zusammenfassung | | 5o |
| Literaturverzeichnis | | 51 |

## Verzeichnis der Abbildungen


Seite

1. Die schnelle Potentialschwankung 4
2. Querschnitt des Epithels 7
3. Versuchsanordnung 8
4. Mikroelektrode in situ 1o
5. Messung des Mikroelektrodenwiderstands 11
6. Penetration 13
7. Der Spike entsteht an der alleräußersten Zellmembran 18
8. Die Wirkung von Digitonin 2o
9. Der Einfluß von Amphotericin B 22
1o. Der Einfluß von Amphotericin B auf die verzögerte Gleichrichtung 23
11. Das Potentialprofil des Epithels 28
12. Die Lokalisation des Hauptwiderstands 32
13. Die Lokalisation der schnellen Potentialschwankung 35
14. Membranmodell 42

## Einleitung

Seit Emil du Bois-Reymond Mitte des vorigen Jahrhunderts die elektromotorische Kraft der Froschhaut entdeckte (10), ist das Interesse der Physiologen an diesem Gegenstand und glücklicherweise auch unsere Kenntnis des Gewebes stark angewachsen.

Das liegt gewiß zum guten Teil daran, daß die Froschhaut leicht gewonnen werden kann, genügend lange in vitro überlebt und wegen ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Beanspruchungen in einfachen Versuchsanordnungen bequem zu handhaben ist.

Besonders in den letzten Jahren ist eine Reihe von Befunden zusammengetragen worden, die sich zwanglos in ein übersichtliches, an manchen Stellen allerdings noch unvollständiges Bild von der Physiologie der Froschhaut einfügen lassen.

Die EMK des Epithels, die mehr als 100 mV betragen kann, Außenseite (Teichwasser) negativ gegen Innenseite (Corium), wird aufrechterhalten durch einen aktiven Transport von $Na^+$ aus der Umgebung in das Innere des Tieres. Durch die äußere Membran, die ein passives Diffusionshindernis darstellt, dessen Widerstand durch $Ca^{++}$ erhöht und durch ADH gesenkt werden kann (6, 20), strömt Natrium in die Epithelzelle hinein. Hier soll fast die Hälfte der Natriumionen komplex gebunden werden (47), ein Mechanismus, der dazu beitragen könnte, den Frosch vor Salzverlusten in stark hypotonen Bädern zu schützen.[1] Aus diesem

---

1) Allerdings ist aus autoradiographischen Untersuchungen bekannt, daß $Na^+$ im Corium gebunden werden kann (23). Diese Möglichkeit ist von den Autoren nicht berücksichtigt worden.

intrazellulären Reservoir schöpft die Pumpe, die $Na^+$ aus der Zelle heraus in die interzellulären Spalträume transportiert (13). Mit der Messung von Kurzschlußstrom und unidirektionalen Isotopenflüssen (51) ist es möglich, Aussagen zu machen über die Abhängigkeit des $Na^+$-Transportsystems von verschiedenen Parametern. Es zeigt sich, daß die Pumpe vom Zellstoffwechsel angetrieben wird, daß für 16-20 transportierte Natriumionen 1 M $O_2$ verbraucht (33, 56) oder (unter anaeroben Bedingungen) für 1.7 M $Na^+$ 1 M Milchsäure gebildet wird (34). Die Pumpe kann mit Insulin aktiviert (19, 21) und mit Ouabain vergiftet werden (40).

Neben diesen mehr biochemischen Befunden haben seit den Arbeiten Gildemeisters und seiner Schüler (16) besonders auch elektrophysiologische Daten zur Erweiterung unseres Wissens über die Froschhaut beigetragen.

Wenn man dem Epithel einen rechteckigen Stromimpuls aufprägt, verhält es sich in erster Näherung wie ein RC-Glied, d.h. wie ein Zweipol, bestehend aus einem Kondensator mit einer Kapazität von 2-5 $\mu F.cm^{-2}$ und einem parallelgeschalteten Widerstand von 0.5-1.0 $KOhm.cm^2$: Die Membrankapazität wird exponentiell aufgeladen und entlädt sich wieder nach Abbruch des Stromimpulses über den Parallelwiderstand einer fallenden e-Funktion folgend (Abb.1).

Dieses Verhalten zeigt eine Vielzahl biologischer und künstlicher Membranen über einen weiten Bereich unterschiedlicher Stromdichten. Bei der Froschhaut aber und einigen anderen Epithelien ist der Widerstand nicht unbedingt konstant, sondern oberhalb einer bestimmten Stromdichte kommt es zu einem plötzlichen Anstieg des Widerstandes mit nachfolgendem Abfall unter den Ausgangswert. Bei galvanostatischer Auslösung (konstanter Strom) zeigt sich diese Widerstandsänderung in einer Potential-

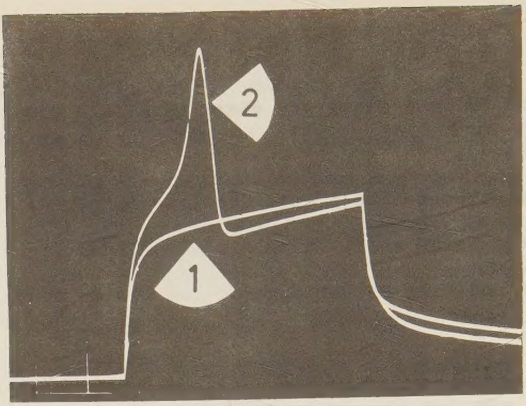
schwankung von 10 msec Dauer und einer Amplitude von 200 mV (14, 15). (Abb.1).

Der Spike ist gekennzeichnet, wie ähnliche Phänomene an anderen erregbaren Strukturen auch, durch ein Alles-oder-Nichts Verhalten, eine Rheobase und eine Refraktärzeit, die bis zu einer Minute lang sein kann.

Notwendige Voraussetzung für das Zustandekommen einer schnellen Potentialschwankung ist die Anwesenheit von $Na^+$ oder $Li^+$ in der äußeren Badlösung und ein Impuls genügend hoher Stromdichte, damit bei vorgegebenem Membranwiderstand das Schwellenpotential erreicht wird. Dabei muß der Strom in der Einwärtsrichtung fließen (Anode außen, Kathode innen), das Ruhepotential also vermindert bzw. umgekehrt werden.

Da das Epithel der Froschhaut ein relativ kompliziert aufgebauter Zellverband ist (Abb.2), entsteht die Frage, wo in diesen fünf oder mehr Schichten die Membran zu suchen sei, die zu schnellen Änderungen ihrer Permeabilität, welche ja der schnellen Potentialschwankung zugrunde liegen, fähig ist. Die Tatsache, daß der Spike sehr rasch auf Änderungen des Außenmediums reagiert, läßt schon vermuten, daß diese Membran außen gelegen sein muß (15). Dafür spricht auch der Befund, daß das ADH, welches den $Na^+$-Widerstand der äußeren Diffusionsschranke erniedrigt (6,20), die Rheobase der schnellen Potentialschwankung erhöht (30).

Wo aber liegt die äußere Diffusionsschranke? Koefoed-Johnsen und Ussing glauben, daß sie zwischen den toten Zellen des stratum corneum und den lebenden des str. germinativum gesucht werden muß (27). Die strenge Zuordnung der äußeren Diffusionsschranke zu einer Zellmembran des Epithels ist von großer Bedeutung für ein Verständnis der Permeabilitätseigenschaften der Froschhaut.



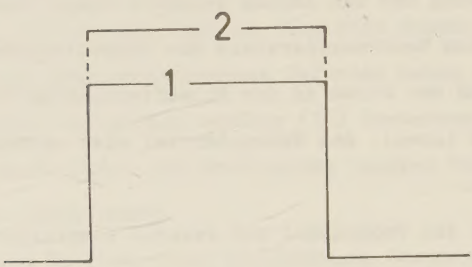




Abb.1 Die schnelle Potentialschwankung

Bei Stromdichten, die groß genug sind, das Membranpotential über den Schwellenwert zu heben, überlagert sich der RC-Aufladung des Gewebes (1) eine schnelle Potentialschwankung (2) von im allgemeinen 1o msec Dauer und einer Amplitude von etwa 2oo mV.
Nach diesem 'Spike' ist der Gleichstromwiderstand des Epithels erniedrigt und erholt sich erst langsam innerhalb einer Minute wieder.
Bei einigen Epithelien (wie auch hier) kommt es zu Polarisationserscheinungen im Gewebe, die einen langsamen, zusätzlichen Potentialanstieg während des Stromflusses und nach Abbruch des Impulses eine verzögerte Rückkehr zum ursprünglichen Membranpotential bedingen.

Mit Hilfe von Mikroelektroden wurde die Membran, welche funktionell als äußere Diffusionsschranke anzusprechen ist und über welcher der Spike entsteht, im Gewebe identifiziert. Die Versuchsergebnisse sollen in der vorliegenden Arbeit beschrieben und diskutiert werden.

Nach einer Hypothese von Andersen und Ussing (1) besteht die äußere Diffusionsschranke aus einer oberflächlichen, homogenen ionenspezifischen und einer darunter gelegenen, porösen unspezifischen Barriere. Weiterhin sind Hinweise dafür vorhanden, daß die äußere Barriere aus Lipoiden, die innere aus Proteinen besteht. Durch das Studium des Einflusses von Digitonin und Amphotericin B, welche Komplexe mit Membransterolen bilden können, sollte der Versuch gemacht werden zu entscheiden, welche der Barrieren (wenn nicht beide zusammen) für die Entstehung des Spikes verantwortlich ist.

## Methodik

Die Versuche wurden im Sommer und Herbst 1967 an männlichen und weiblichen Fröschen der Species Rana esculenta durchgeführt. Die Tiere wogen, nachdem sie mehrere Wochen bei + 4°C ungefüttert gehalten worden waren, zwischen 40 und 80 gr.

P r ä p a r a t i o n . Hautstücke entsprechender Größe wurden sorgfältig von Kinn, Bauch und den Ventralseiten von Ober- und Unterschenkel abpräpariert und für wenigstens 20 min in mit Luft durchperlter Frosch-Ringerlösung gebadet, bevor sie in die Kammer eingelegt wurden. Darauf konnte sich die Haut während weiterer 20 min mit Außen- und Innenlösung ins Gleichgewicht setzen. Dann erst begann der Versuch.

V e r s u c h s a n o r d n u n g . Den Aufbau der Plexiglaskammer zeigt Abb.3. Über den zentral durchbohrten Poller wird die Haut mit der Außenseite nach oben gebunden. Sie trennt so mit einer Oberfläche von 0.28 $cm^2$ ein äußeres Kompartiment (5.0 ml) von einem inneren (0.1 ml). Gerührt wurde nicht (15). Ein Wechsel der Außenlösung war leicht und schnell möglich. Sollte die Innenlösung gewechselt werden, wurde die Haut umgekehrt in die Kammer eingelegt. Bei 400-facher Vergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40x) konnten die Schichten des Epithels, besonders die äußere Lage mit ihren Zellgrenzen ('chicken fence') und Kernen meist deutlich unterschieden werden (Abb.4); wenn nicht, wurde der Kontrast durch Zugabe einiger Kristalle Methylenblau oder Toluidinblau zur Außenlösung gehoben. Bei Einwirkungszeiten von wenigen Minuten ließ sich kein schädigender Einfluß der Farbstoffe auf das Epithel nachweisen. Stromimpulse von 2--3 msec Dauer aus einem Tektronix-Impulsgenerator passierten einen Bahnwiderstand von 100 KOhm (bzw.115 KOhm,

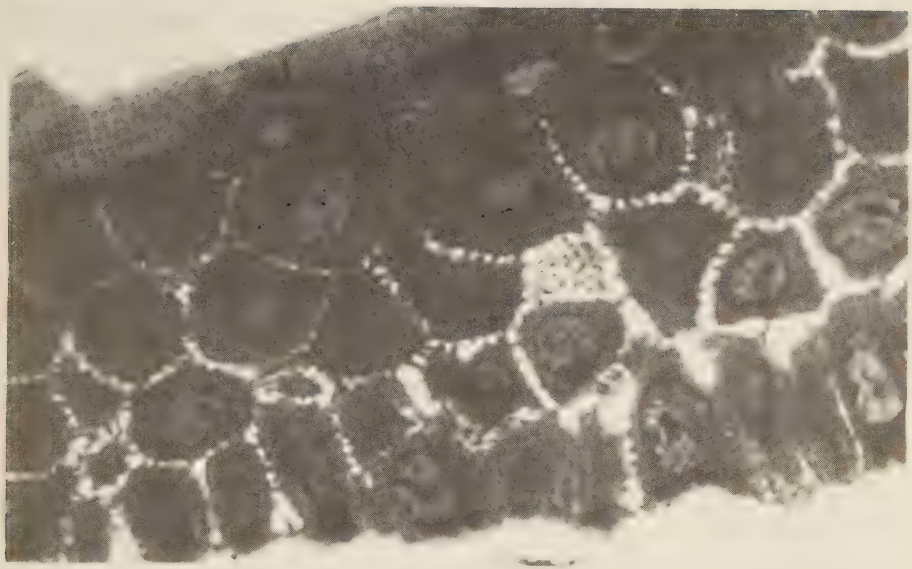


Abb.2 Querschnitt des Epithels

Das Epithel besteht aus 6 - 7 Zellschichten.Das stratum corneum umfaßt zwei Lagen, von denen die oberste zum Teil schon abgestoßen ist (links im Bild). Die interzellulären Spalträume erscheinen in den mittleren Schichten besonders weit. Allerdings ist es schwierig zu beurteilen, inwieweit es sich hier um Fixierungsartefakte handelt. Jede Epithelzelle ist auf vielfältige Weise mit ihren Nachbarzellen verbunden.
(Glutaraldehyd-Fixation, Araldit-Einbettung, Dünnschnitt 1/u, versilbert)

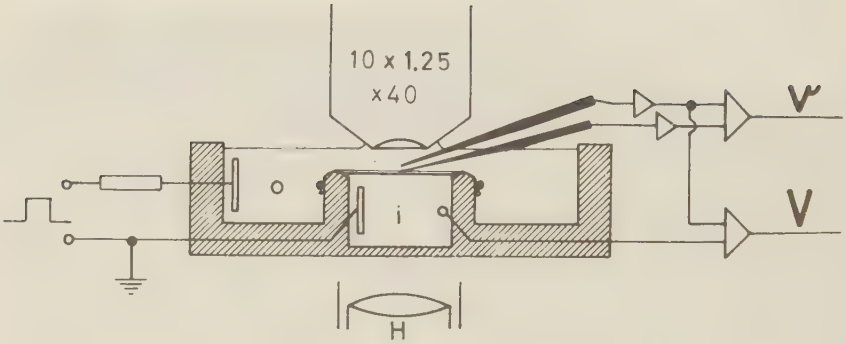



Abb.3 Versuchsanordnung

Die Kammer besteht aus einem Plexiglastrog mit zentral durchbohrtem Poller (schraffiert). Über den Poller wird die Haut mit der Außenseite nach oben gebunden und trennt so ein äußeres Kompartiment (o) von einem inneren (i). Das Epithel kann mit Hilfe eines Heine-Kondensors (H) und eines Wasserimmersionsobjektives im Durchlicht betrachtet werden. Von links erfolgt die Stromzuführung über Ag-AgCl-Elektroden. Rechts sind die Elektroden und Verstärker für die Potentialmessung schematisch dargestellt. Der Übersichtlichkeit wegen wurde die in einigen Versuchen benutzte Agar-Ringer-Elektrode des äußeren Kompartiments nicht eingezeichnet.

um bei Häuten mit niedriger Rheobase eine genauere Einstellung der Stromdichte zu ermöglichen) und wurden dem Epithel über Ag-AgCl-Elektroden aufgeprägt. Gegen den hohen Bahnwiderstand können Impedanzänderungen der Froschhaut unberücksichtigt bleiben, so daß der Strom konstant gehalten wird. Das Gesamtpotential der Haut (V) wurde entweder mit Hilfe von zwei Kalomelelektroden gemessen, die über Agar-Ringerbrücken mit dem inneren und äußeren Kompartiment verbunden waren oder als Potentialdifferenz zwischen äußerer Mikroelektrode und innerer Kalomelelektrode. Die zweite, in eine Zelle der obersten Schicht eingeführte Mikroelektrode ermöglichte es, die Potentialdifferenz über der äußersten Zellmembran (v) und über den restlichen Widerständen des Gewebes (V-v) zu registrieren. Die Potential-Zeit-Verläufe wurden auf dem Schirm eines Oszillographen gespeichert und anschließend photographiert.

M i k r o e l e k t r o d e n . Die Mikroelektroden wurden auf einem Eccles-Puller aus Corning-Glass gezogen, in 3 m KCl erhitzt bis zwei Luftblasen aus jedem Elektrodenschaft aufgestiegen waren und dann unter vermindertem Luftdruck periodisch zum Sieden gebracht, bis sich auch die Spitzen gefüllt hatten (aber insgesamt nicht länger als 2 min).[1] Der Widerstand der Elektroden lag zwischen 6 und 60 MOhm. Er wurde während des Versuches mit einem Vorimpuls ständig gemessen und registriert (Abb.6): Ein Tektronix Impulsgenerator lieferte einen rechteckigen Stromstoß, der zunächst integriert wurde, so daß eine Rampe entstand (Abb.). Der Strom durch den Kondensator von 1 pF ist wegen der hohen Eingangsimpedanz

---

1) Die Mitteilung dieser Methode verdanken wir Herrn Prof.Meves, Kiel, der uns freundlicherweise auch das notwendige Gerät zur Verfügung stellte.

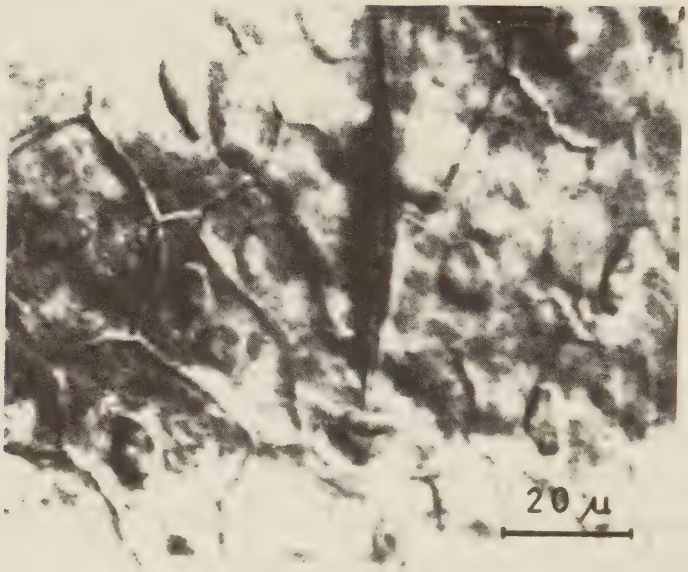



Abb.4 Mikroelektrode in situ

Das nicht gefärbte Epithel befindet sich in der Kammer. Zellgrenzen ('chicken fence') und Kerne der äußersten Schicht sind deutlich zu erkennen. Die Mikroelektrode ist eingestochen. Ihr Schaft hebt eine Falte der Zellmembran hoch, ihre Spitze ist in den Kern eingedrungen.
Die zweikernige Zelle links neben der punktierten weist darauf hin, daß das Epithel nicht zur Haut sondern zur Schallblase des Frosches gehört. Die Schallblase wurde hier aus photographischen Gründen gewählt. Sie zeigt genau wie die Haut eine schnelle Potentialschwankung.

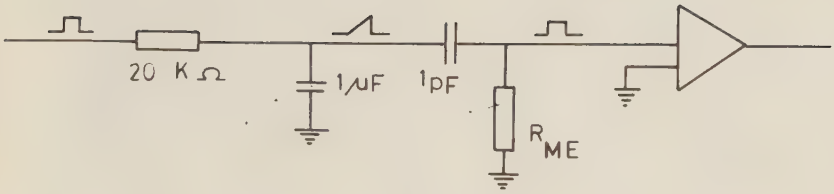



Abb.5 Messung des Mikroelektrodenwiderstands

Der Widerstand der Mikroelektroden kann mit einem Vorimpuls, der an den Eingang des Mikroelektrodenverstärkers gegeben wird, ständig gemessen werden. Ein Rechteckimpuls aus einem Tektronix-generator durchläuft zunächst ein Integrierglied bestehend aus einem Widerstand von 20 KOhm und einem Kondensator von 1 µF. Die entstandene Rampe wird dann in ein differenzierendes Netzwerk eingespeist, dessen Widerstand von der Mikroelektrode dargestellt wird ($R_{ME}$). Aus der Rampe wird wieder ein Rechteckimpuls, dessen Amplitude dem Widerstand $R_{ME}$ proportional ist. (s.Text)

des Mikroelektrodenverstärkers gleich demjenigen, der durch die Elektrode ($R_{ME}$) fließt: $I = c \cdot \dot{v} = V_g \cdot R_{ME}^{-1} = \text{const.}$ Für $R_{ME}$ gilt folglich $R_{ME} = \frac{1}{c \cdot \dot{v}} \cdot V_g$, d.h., die Amplitude des Vorimpulses ($V_g$) ist proportional dem Mikroelektrodenwiderstand ($R_{ME}$). Das gilt streng nur dann, wenn die Elektrode sich wie ein ohmscher Widerstand verhält, wenn nämlich ihre Streukapazität durch die richtig eingestellte Mitkopplung des Vorverstärkers kompensiert wird. Kriterium dafür ist das horizontale Dach des Vorimpulses am Ausgang des Verstärkers, da dann der Kondensator, in den die Rampe eingespeist wird, mit dem Elektrodenwiderstand als reines Differenzierglied arbeitet (36).

P e n e t r a t i o n . Abb.6 zeigt einen typischen Penetrationsvorgang. Impuls A ist der den Mikroelektrodenwiderstand messende Vorimpuls, Impuls B der das Epithel stimulierende Hauptimpuls. Registriert wird die Potentialdifferenz zwischen Mikroelektrode und Innenlösung. Die Elektrode wird mit Hilfe eines Mikromanipulators in einem Winkel von etwa $10^{\circ}$ gegen die Haut vorgetrieben. Für größere Winkel wurde das Wasserimmersionsobjektiv gegen ein Heiztischobjektiv (32x) mit einem Arbeitsabstand von 8 mm ausgewechselt. Zunächst befindet sich die Meßelektrode über dem Epithel in der Außenlösung. Das Gesamtpotential der Haut wird registriert (Spur 1 in Abb. 6). Der Mikroelektrodenwiderstand beträgt 25 MOhm. Während die Elektrode die äußere Zellmembran durchdringt, steigt ihr Widerstand wahrscheinlich bedingt durch Verbiegungen der Spitze, auf 44 MOhm. Das Potentialsignal ist stark verformt (Spur 2 in Abb.6). Gleichzeitig sieht man im Mikroskop, wie die Elektrodenspitze die Membran eindellt und ein Stück vor sich herschiebt, allerdings nie mehr als eine Zellbreite (Abb.4). Wenn jetzt die Elektrode um wenige Mikron vorgestoßen wird (von Hand oder durch einen vom

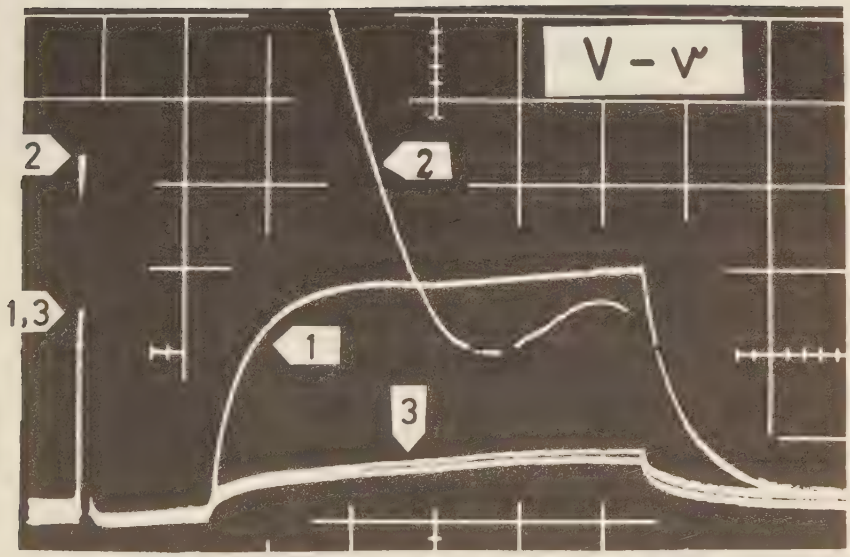



Abb.6 Penetration

Der Potentialverlauf zwischen Mikroelektrodenspitze und Innenlösung (V-v) wird registriert.

Spur 1 : Mikroelektrode befindet sich über der Haut.

Spur 2 : Penetration

Spur 3 : Mikroelektrode hat die äußerste Zellmembran durchstoßen.

Abszisse : 5 msec/Skt.

Ordinate : Vorimpuls $10^7$ Ohm/Skt. ; Hauptimpuls 50 mV/Skt.

Stromdichte : $30\ \mu A/cm^2$

Reizgerät getriebenen Schrittmotor um jeweils 1 /u), sinkt der Mikroelektrodenwiderstand auf seinen alten Wert und das Potentialsignal zeigt wieder seinen gewohnten Verlauf nur mit sehr viel niedrigerer Amplitude (Spur 3 in Abb.6). Größter Wert wurde darauf gelegt, durch genaue Bestimmung des Mikroelektrodenvorschubs, durch Bewegen und Punktieren des Kerns sicherzustellen, daß die Elektrodenspitze sich in einer Zelle der äußersten Lage befand und nur die alleräußerste Zellmembran durchstoßen hatte.

L ö s u n g e n .

a) Innenlösungen

Frosch-Ringerlösung (NaCl): NaCl 100, $K_2HPO_4$ 1.9, $KH_2PO_4$ 0.1, $NaHCO_3$ 2.0, $CaCl_2$ 1.0 mM/l.

Frosch-Ringerlösung (KCl): KCl 100, $K_2HPO_4$ 1.9, $KH_2PO_4$ 0.1, $KHCO_3$ 2.0, $CaCl_2$ 1.0 mM/l.

Frosch-Ringerlösung ($Na_2SO_4$): $Na_2SO_4$ 55.8, $K_2SO_4$ 2.5, $Na_2HPO_4$ 0.67, $KH_2PO_4$ 0.17, $CaSO_4$ 1.0 mM/l.

Frosch-Ringerlösung ($K_2SO_4$): $K_2SO_4$ 58.3, $K_2HPO_4$ 0.67, $KH_2PO_4$ 0.09, $CaSO_4$ 1.0 mM/l.

Das pH aller Lösungen war 7.4.

b) Außenlösungen

Die Außenlösung wurde durch 10-faches Verdünnen der entsprechenden Innenlösung hergestellt.[1] Das pH der verdünnten Lösungen war meist etwas niedriger als das der unverdünnten. Digitonin- und Amphotericin B-Lösungen wurden mit 1:10 verdünnter Ringerlösung hergestellt. Die Substanzen änderten das pH nicht. Für Ampho-

---

1) Die geringe Leitfähigkeit der Außenlösung führt zu einer Ionenverarmung und damit zu einer Erhöhung des Widerstandes der äußeren Diffusionsschranke.

tericin B, dessen genaue stöchiometrische Zusammensetzung nicht bekannt ist, wurde ein Molekulargewicht von 950 angenommen. Die verwendete lyophilisierte Amphotericin B-Präparation der Fa. Chem.Fabrik von Heyden A.G. enthält 50 mg Amphotericin B, 41 mg Natriumdesoxycholat, 10 mg $Na_2HPO_4$, 0.89 mg $NaH_2PO_4$ und 6.2 mg NaCl. Bei langer Versuchsdauer wurde die Kammer in Registrierpausen mit einem schwarzen Kästchen abgedeckt, da das Antibioticum sehr lichtempfindlich ist.

H i s t o l o g i e . Von einigen Froschhäuten wurden histologische Schnitte angefertigt: Gefrierschnitte (8 /u; nicht fixiert; mit Methylenblau gefärbt) und Dünnschnitte (1 /u; fixiert mit Glutaraldehyd; versilbert oder mit Methylenblau gefärbt).1)

---

1) Wir danken Herrn Dr.Booz (I.Anat.Inst.,Homburg) und Herrn Dr.Werner (Inst.f.Cyt.u.Elektronenmikr.,Homburg) für ihre bereitwillige Unterstützung.

## Ergebnisse

### I. Supravitalfärbung

Wenn Einzelheiten der äußersten Zellschicht ('chicken fence' und Kerne) trotz der Möglichkeit kontinuierlichen Wechsels der Beleuchtungsart mit Hilfe eines Heine-Kondensors nicht klar zu erkennen waren, haben wir versucht, den Kontrast durch Färbung zu verbessern. Nach wenigen Minuten Einwirkungszeit der Farbstoffe hatten sich 'chicken fence', Kerne (hauptsächlich der zweiten und tieferer Schichten) und die Kerne der Ausführungsgänge der Hautdrüsen sowie deren Lumina angefärbt. Nur basische Farbstoffe waren wirksam;saure nicht, mit Ausnahme von Fluorescein, das manchmal Kerne und Zellgrenzen der alleräußersten Schicht anfärbte. Das Ausmaß der Färbungen war sehr unterschiedlich, vielleicht abhängig von der Regenerationsphase der Froschhaut.
Die Resultate widersprechen denen von Ussing, der gefunden hatte, daß Farbstoffe, darunter auch Methylenblau und Fluorescein, nicht in die Haut penetrieren können (53).
Der Durchmesser der Zellen der obersten Schicht war 2o -4o /u, ihre Tiefe 5 - 1o /u. Das ganze Epithel war 4o - 6o /u dick.

### II. Die Potentialdifferenz über der alleräußersten Zellmembran

Ziel dieser Untersuchungen war nicht, die Potentialverteilung im Epithel zu messen; darüber liegt eine Reihe von Arbeiten vor (1o,44,48,49,5o,52,54). Es zeigte sich aber, daß die Zellen

der obersten Schicht in einigen Fällen auf gleichem Potential lagen wie die Außenlösung, in anderen darüber oder darunter. Gründe, die dieses Verhalten erklären könnten, werden in der Diskussion kurz angeführt.

III. Der Widerstand der alleräußersten Zellmembran

Die Potentialdifferenz V-v zwischen Mikroelektrode und innerer Referenzelektrode (Masse) ist bei konstantem Strom dem Widerstand des Gewebes, das zwischen beiden Elektroden liegt, proportional.

Wenn die Mikroelektrode die alleräußerste Zellmembran durchstoßen hat, hat sie auch den größten Teil des Widerstandes hinter sich gelassen. Nur etwa 10 bis höchstens 50 Prozent des Gesamtwiderstandes des Epithels verbleibt zwischen ihr und Masse (Abb.6). Der Hauptwiderstand, nämlich 50 bis 90 Prozent liegt also in der alleräußersten Zellmembran.

Nur an wenigen Epithelien fanden wir den größten Widerstand an der Membran zwischen erster und zweiter Zellschicht. Man muß annehmen, daß diese Frösche kurz vor der Häutung standen und die Verbindung zwischen den beiden obersten Zellagen schon teilweise gelöst war (Verschluß der zonulae occludentes in der zweiten Schicht).

IV. Die Lokalisation der schnellen Potentialschwankung

Bei allen Versuchen wurde der Spike dort gefunden, wo auch der größte Widerstand lokalisiert war, nämlich an der alleräußersten Zellmembran. Der Spike erscheint im Potentialverlauf v

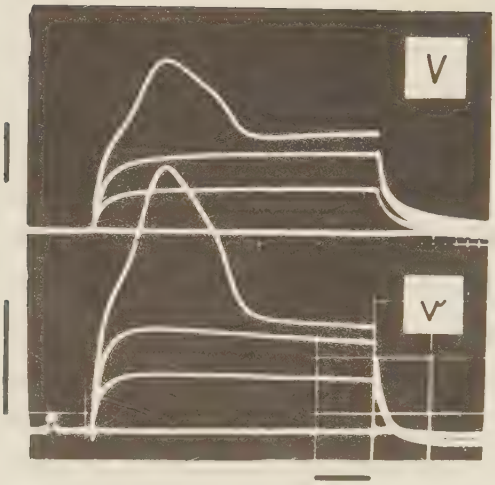



Abb.7 Der Spike entsteht an der alleräußersten Zellmembran

Gleichzeitige Registrierung des Gesamtpotentials V und des Potentials über der alleräußersten Zellmembran v.
Abszisse : 5 msec/cm
Ordinate : 2oo mV/Skt.
Stromdichten : 1oo,2oo,3oo /uA/cm$^2$

zwischen Mikroelektrode (eingestochen in eine Zelle der obersten Schicht) und Außenlösung, nicht aber zwischen Mikroelektrode und Innenlösung (V-v) (Abb.7)[1].

Häufig war die Spikeamplitude in der Mikroelektrodenspur v sehr viel niedriger als im Potentialverlauf V über der Gesamthaut. Die Ursache ist wahrscheinlich eine unvollständige Abdichtung zwischen Elektrodenschaft und Zellmembran. Wird die Elektrode in flachem Winkel zur Hautoberfläche nur etwas weiter vorgetrieben, wächst auch die Amplitude in v. In glücklichen Fällen sind schließlich beide Amplituden gleich groß (obwohl die Elektrodenspitze die äußerste Zellage nicht verlassen hat).

V. Die Wirkung von Digitonin

Digitonin in Konzentrationen von 0.04 - 0.2 mM/l senkt innerhalb weniger Minuten den epithelialen Gleichstromwiderstand. Während bei einer unbehandelten Haut der Kaliumwiderstand (gemessen mit Frosch-Ringerlösung ($K_2SO_4$ od. KCl) außen) höher ist als der Natriumwiderstand (gemessen mit Frosch-Ringerlösung ($Na_2SO_4$ od. NaCl) außen), geht dieses Unterscheidungsvermögen unter Digitonin verloren.

Eine schnelle Potentialschwankung läßt sich nicht mehr auslösen.

An solchem Zusammenbruch muß der große Widerstand der alleräußersten Zellmembran beteiligt sein. Abb. 8 zeigt, daß er praktisch null wird.

---

1) Wenn allerdings der Hauptwiderstand zwischen erster und zweiter Zellschicht gefunden wird, entsteht dort auch der Spike.

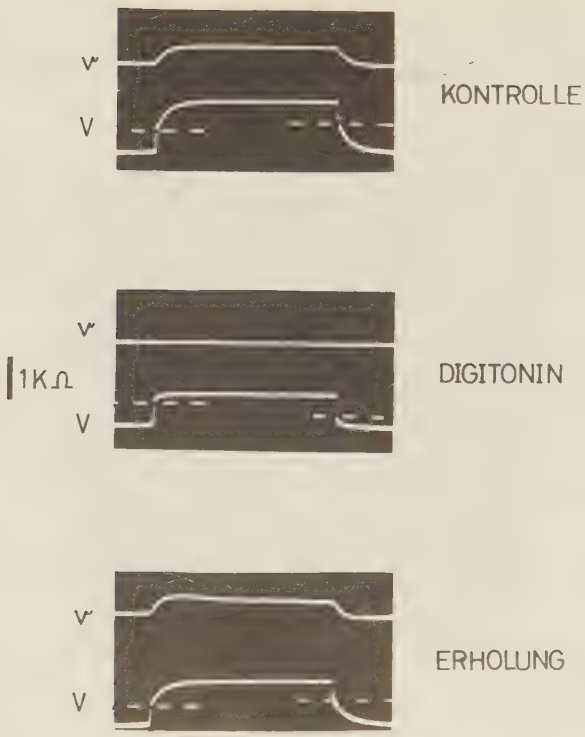



Abb.8 Die Wirkung von Digitonin

23 min nach Zugabe von o.1 mM/l Digitonin zur Außenlösung ist der Widerstand der alleräußersten Zellmembran (Potentialsignal v) praktisch null geworden. Entsprechend ist auch der Gesamtwiderstand des Epithels (Potentialsignal V) klein. 3o min nach Auswaschen des Digitonins haben sich die Widerstände erholt.
Die gestrichelten Linien deuten denjenigen Anteil der Amplitude von V an, der auf den Bahnwiderstand der Ringerlösung zwischen Elektroden und Epithel zurückzuführen ist.Dem Widerstand des Epithels entspricht die Erhebung des Impulsdaches über die vordere gestrichelte Linie, bzw.der Abstand zwischen Basislinie und der hinteren gestrichelten Linie.
Innenlösung : Frosch-Ringerlösung ($Na_2SO_4$)
Außenlösung : Frosch-Ringerlösung ($K_2SO_4$) , 1:1o verdünnt.

Der Effekt ist reversibel. In längstens einer Stunde restituieren sich die Widerstände, die $Na^+$-$K^+$-Diskriminierung kehrt zurück und schließlich auch die schnelle Potentialschwankung.

VI. Der Einfluß von Amphotericin B

Amphotericin B hat einen charakteristischen Einfluß auf die Form der schnellen Potentialschwankung. Schon ohne die Substanz verläuft die Abfallflanke des Spikes häufig mehr oder weniger ausgeprägt biphasisch: sie besteht aus einem ersten, langsamen, d.h. flachen und einem zweiten, schnellen, d.h. steilen Teil. Unter Amphotericin B wird die erste Phase der Abfallflanke länger und noch langsamer (Abb.9).
Das gilt auch für solche Spikes, deren Abfallflanke zunächst keine 'Schulter' erkennen lassen. In Extremfällen wird das Spitzenpotential evtl. bis zum Abbruch des Stromimpulses gehalten. Auch wenn die zweite Phase des Potentialabfalles noch zu sehen ist (zu Beginn der Amphotericin B-Wirkung oder bei längeren Stromimpulsen) ist der Widerstand des Epithels kurz nach dem Spike immer etwas höher als bei unbehandelten Häuten. Das Spitzenpotential ist um etwa 20 Prozent niedriger.
Diese Effekte bilden sich innerhalb einer Stunde aus, wobei in den ersten 30 Minuten kaum eine Veränderung zu bemerken ist. Voraussetzung ist, daß Amphotericin B in Konzentrationen von 0.026-0.06 mM/l außen zugesetzt wird und daß Chlorionen im System vorhanden sind. Amphotericin wirkt weder auf der Innenseite noch dann, wenn Sulfat- oder Glukonationen als Anionen dienen. Einen Einfluß auf die Ruhewiderstände hat Amphotericin im Gegensatz zu Digitonin nicht. Auch die Rheobase bleibt unverändert.

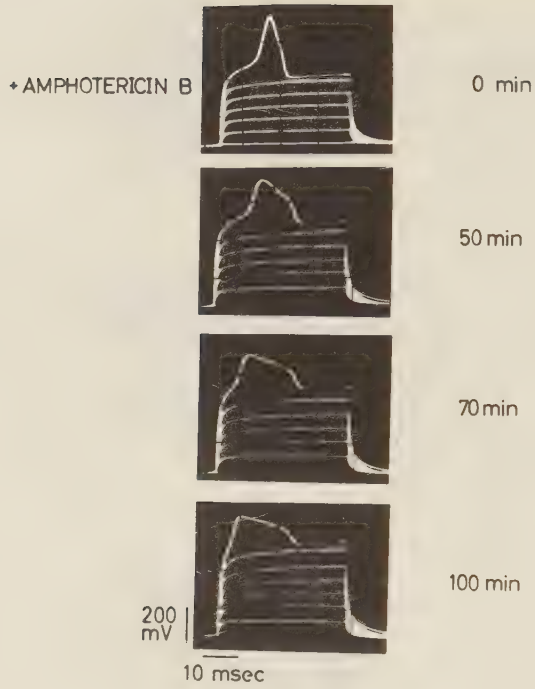



Abb.9 Der Einfluß von Amphotericin B

Der Spike zeigt nach Zugabe von o.o26 mM/l Amphotericin B zur Außenlösung charakteristische Veränderungen, die sich langsam entwickeln. Die Schulter der Abfallflanke wird herausgehoben, der Widerstandsabfall nach dem Spike vermindert und das Spitzenpotential erniedrigt. Der Ruhewiderstand wird nicht verändert. Die verschiedenen Stromdichten (nämlich 15,3o, 45,6o,75,9o,1o5 $/uA/cm^2$) entsprechenden Kurven sind hier (durch die Spannungsentwicklung an der inneren Stromelektrode) auseinander gezogen. Die Bilder gewinnen dadurch an Klarheit. Die wahre Größe der Potentialschwelle beträgt in allen Fällen etwa 2oo mV.

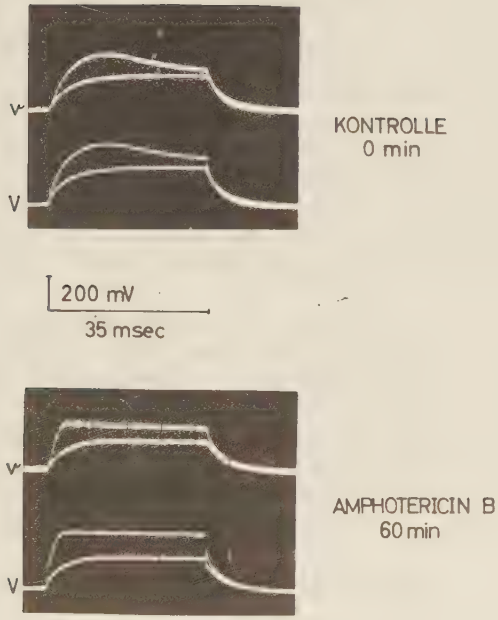



Abb.1o Der Einfluß von Amphotericin B auf die verzögerte Gleichrichtung

In $Na^+$-freier Außenlösung kann kein Spike entstehen.Es kommt lediglich zur verzögerten Gleichrichtung (Kontrolle).
Der untere Teil der Abbildung zeigt den Effekt von o.o3 mM/l Amphotericin B 6o min nach Zugabe zur Außenlösung.
Obere Spuren jeweils Mikroelektrodenregistrierung des Membranpotentials der äußersten Zellmembran (v), untere Spuren transepithelialer Sprung (V).

Alle Effekte des Amphotericin B sind schnell, oft innerhalb weniger Minuten reversibel. Eine ähnliche, ebenfalls reversible Wirkung hat Amphotericin B auf die verzögerte Gleichrichtung bei $Na^+$-freier Außenlösung. Auch hier bleibt der erwartete Widerstandsabfall nach dem Potentialmaximum aus (Abb.10).

Mit Hilfe der Mikroelektrodentechnik konnten wir zeigen, daß alle durch Amphotericin verursachten Veränderungen sich auf die alleräußerste Zellmembran beschränken.

Natriumdesoxycholat, welches in der verwendeten Amphotericin B Präparation enthalten ist, hatte in Konzentrationen, die denen in den Ansätzen entsprachen, keinerlei Einfluß auf die elektrischen Eigenschaften der Froschhaut.

## Diskussion

### I. Morphologie

Es erscheint zweckmäßig, der näheren Betrachtung der Ergebnisse einige Bemerkungen zum Feinbau des Froschhautepithels vorauszuschicken und dabei zu versuchen, eine Beziehung zwischen unseren Kenntnissen von der Funktion des Gewebes und der Histologie herzustellen.

Die Epidermis von Rana esculenta ist 40-60 µ dick (Abb.2)[1]. Das Epithel besteht aus 5-7 Schichten. Die Zellen wandern von der Basalschicht aus im Laufe ihres Lebens an die Oberfläche, wo sie in Perioden von einer bis mehreren Wochen abgestoßen werden (43). Bei ihrer Wanderung machen sie charakteristische Formveränderungen durch, so daß man außer der Basalzellschicht (stratum germinativum) ein str.spinosum, ein str. granulosum und schließlich ein str. corneum unterscheiden kann.

Zwischen Epidermis und Corium liegt die Basalmembran. Sie stellt ein 200-300 Å dickes Kissen dar (44), welches aus einer Mucopolysaccharidmatrix besteht, in die feine, parallel zur Hautoberfläche verlaufende Filamente von Tropokollagenmolekülen eingebettet sind. Die Basalmembran ist vermutlich ein Produkt der Epithelzellen und wird nicht etwa von Fibrozyten des Coriums gebildet (28, 29). Mit den Zellen des str.germinativum ist sie durch

---

1) Gemessen sowohl am lebenden Präparat in unserer Kammer durch Fokussieren, eine Methode, die trotz Verwendung präziser Feintriebe (1 Skt. = 1 µ) mit großen Fehlerquellen behaftet ist, (40), als auch am Gefrierschnitt, der, um jede Volumenänderung zu vermeiden, nur mit isotoner Frosch-Ringerlösung in Berührung gekommen war.

vielgestaltige Fortsätze verbunden. Außerdem findet man Halbdesmosomen an den der Basalmembran zugekehrten Teilen der Zellwand (45). Für eine ganze Reihe von Substanzen ist die Basalmembran gut permeabel (12, 13).

Desmosomen und ähnliche Strukturen verbinden auch die Zellen untereinander. Sie sind überaus zahlreich im Epithel vertreten. Einmal verleihen sie ihm mechanische Festigkeit, zum anderen stellen sie als niederohmige, d.h. für kleine Ionen gut permeable Verbindungswege ein Kommunikationssystem zwischen den Zellen dar.

Ein Desmosom (macula adhärens) besteht aus zwei knopfartigen Platten, die sich an den Membranen benachbarter Zellen gegenüberliegen, getrennt durch einen 250 Å breiten interzellulären Spalt. An ihnen enden zahlreiche Tonofibrillen, ziehen aber anscheinend nicht über den Spalt zur anderen Seite. Ähnlich wie die maculae sind auch die zonulae adhärentes gebaut.

Bei der zonula und der größeren fascia occludens jedoch verschmelzen die beiden benachbarten Zellmembranen miteinander (nexus oder tight junction). Zonulae occludentes haben einen sehr großen elektrischen Widerstand senkrecht zum Epithel (Verschluß des interzellulären Spaltes). Sie sind deshalb besonders geeignet, als Schlußleistennetz ('chicken fence') den Zwischenzellraum nach außen abzuschließen. Ihr Widerstand von Zelle zu Zelle dagegen ist sehr niedrig. Man wird daher durch zonulae occludentes verbundene Zellen (für Ionen zumindest) als ein Kompartiment auffassen können und erwarten, daß sie eher auf demselben elektrischen Potential liegen als nicht verbundene Zellen. Entsprechend finden auch die meisten Untersucher bei Punktionsversuchen mit Mikroelektroden nur zwei Potentialsprünge im Epithel (5, 44, 49, 52). Eine Zonula occludens ist aber keine starre Struktur, sondern ihre Permeabilität

hängt von der Zusammensetzung der Zellflüssigkeit auf beiden Seiten ab. Eine Erhöhung der intrazellulären $Ca^{++}$- oder $Mg^{++}$-Konzentration führt zu einer Abdichtung: die benachbarten Zellen werden entkoppelt (38). Vielleicht, wenn auch nicht sehr wahrscheinlich ist diese Dynamik der 'tight junctions' eine Ursache für die zum Teil divergierenden Ergebnisse der Untersuchungen über die Potentialverteilung in der Amphibienhaut (Abb. 11)[1].

Das ganze Epithel wird von einem Netz 150-200 Å breiter, interzellulärer Spalten durchzogen, das mit dem Extrazellularraum jenseits der Basalmembran in Verbindung steht.

In den Membranen, die diese Spalten begrenzen, ist eine Adenosin-Triphosphatase nachgewiesen worden (13). Sie ist Bestandteil der $Na^{+}$-Pumpe, die Natrium aus dem intrazellulären Pool in den Zwischenzellraum transportiert.

Zellen der mittleren Schichten produzieren Muzin, das sie zum Teil behalten, zum Teil in die Spalträume sezernieren (45). Außerdem synthetisiert die Froschhaut Keratin. Zellen des str.corneum (1-2 Lagen) enthalten große Mengen 70-80 Å dicker Keratinfilamente. Endoplasmatisches Reticulum, Golgiapparat und andere Zellorganellen sind meist nicht mehr zu sehen (45). Dieser morphologische Aspekt und die Analogie zum str.corneum landbewohnender Vertebraten hat

---

1) Bei den Penetrationen der alleräußersten Zellmembran mit Mikroelektroden, über die im Abschnitt 'Ergebnisse' berichtet wurde, fand sich manchmal eine negative, manchmal eine positive oder gar keine Potentialdifferenz gegenüber die Außenlösung. Als Gründe für die sehr unterschiedlichen Resultate, die bei derartigen Potentialmessungen gewonnen werden, wären denkbar: eine Änderung des Mikroelektrodenspitzenpotentials durch mechanische Alteration und die Zusammensetzung der Zellflüssigkeit, sich ändernde Permeabilitäten der zonulae occludentes und schließlich ein inhomogenes elektrisches Feld; die Potentialdifferenz von etwa 80-120 mV ist die Resultierende zahlloser Spannungsvektoren, die sich durchaus in Betrag und Richtung unterscheiden können.

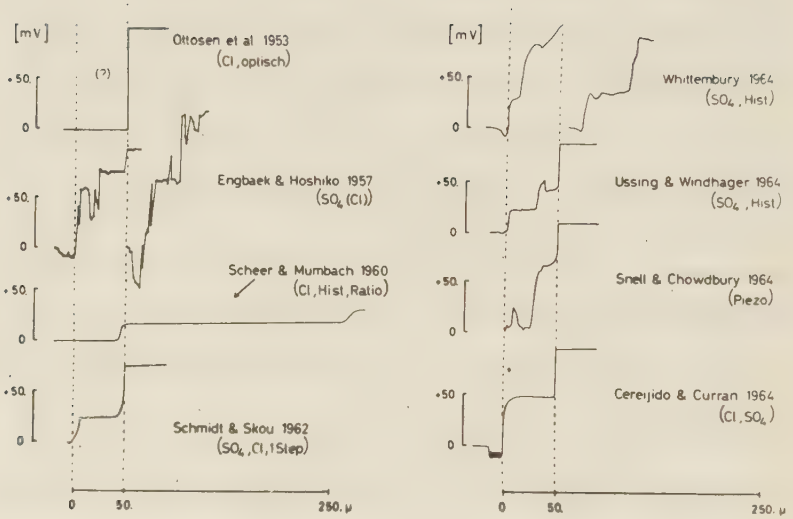



Abb.11 Das Potentialprofil des Epithels

Die Potentialdifferenzen sind aufgetragen gegen die Tiefe des Epithels, in der sie gemessen wurden. Bei 50 /u liegt die Basalmembran. Außer den Autoren sind die Anionen der Badlösungen, die Art und Weise wie die Mikroelektrodenspitze lokalisiert wurde oder der Penetrationsmodus angegeben (5, 11, 48, 49, 50, 52, 54).

dazu geführt, die Zellen der obersten Schicht der Froschhaut als tot anzusehen (22, 52).

Nach unseren Versuchsergebnissen verdient die alleräußerste Zellmembran besonderes Interesse. Das elektronenoptische Bild ist unergiebig. Man sieht, wie bei anderen Membranen auch, eine Doppellinie, die hier nur etwas dichter zu sein scheint. Der Hauptunterschied, der die alleräußerste Zellmembran von denen der tieferen Lagen unterscheidet, ist, daß sie nicht durch niederohmige zonulae occludentes mit darüber liegenden Zellen verbunden ist.

Über ihr liegt nur noch die 'Glycocalyx' (3), eine aus Proteinen und Mucopolysacchariden bestehende Schicht von bis zu 200 /u Dicke, über deren Beitrag zur Permeabilität der Froschhaut zur Zeit noch diskutiert wird.

In der morphologischen Vielfalt, die bisher referiert wurde, ist ein funktioneller Begriff noch nicht aufgetaucht: die 'äußere Diffusionsschranke'. In dem notwendigerweise schematischen Bild, das Koefoed-Johnsen und Ussing (27) aufgrund ihrer Untersuchungen über die Permeabilität der Froschhaut gewannen, sind zwei oder mehr Schichten lebender Epithelzellen (str.germinativum) eingeschlossen zwischen Basalmembran auf der Innen- und ein bis zwei Lagen 'toter', verhornter Zellen auf der Außenseite. Die Membranen der Außenseite des str.germinativum haben einen hohen Gleichstromwiderstand (1 KOhm), die der Innenseite einen niedrigen (0.3 KOhm). Der Widerstand der verhornten Zellen des str.corneum ist praktisch null (54). Die äußere Diffusionsschranke steuert die Flüsse aller Substanzen, die in die Zellen hineinströmen. Sie beeinflußt auch den aktiven Natrium-Transport, indem sie das Angebot an die Pumpe reguliert. Wenn der Begriff 'äußere Diffusionsschranke'

auch rein funktionell ist, so ist es doch wahrscheinlich, daß er der Membran mit dem höchsten Widerstand, d.h. (nach den Befunden von Whittembury (54)) der äußeren Membran des str.germinativum zugesprochen werden muß. Die äußere Diffusionsschranke verhält sich so, als bestünde sie aus zwei hintereinandergeschalteten Barrieren: einer äußeren, homogenen und selektiven sowie einer inneren, porösen und geschwindigkeitsbestimmenden (1, 35, 37, 52). Antidiuretisches Hormon erhöht die Permeabilität der homogenen Barriere für Natrium und Harnstoff und erhöht unspezifisch die Flüsse aller Substanzen, die die erste Barriere passiert haben, durch Weiterstellung der Poren in der zweiten (6, 20, 37). So kommt es unter ADH zu einem Anstieg des Kurzschlußstromes, einem Abfall des Widerstandes und damit zu einer Erhöhung der Rheobase für die schnelle Potentialschwankung, woraus ja schon geschlossen wurde, daß der Spike an der äußeren Diffusionsschranke entsteht (30).

Ein wesentliches Merkmal des eben skizzierten Bildes von der Froschhaut ist, daß alle Zellen zwischen äußerer Diffusionsschranke und Basalmembran einem einzigen Kompartiment angehören. Diese Vorstellung muß aufgrund der Versuche von Biber, Chez und Curran modifiziert werden (4). Wenn Natrium passiv durch die äußere Zellmembran in die Zelle eintreten soll, muß dies unter dem Einfluß eines Konzentrationsgradienten geschehen; das bedeutet, da ein $Na^+$-Einwärtstransport auch dann noch stattfindet, wenn die Außenkonzentration 1 mM/l beträgt, daß die äußeren Zellen nur Spuren von freiem Natrium enthalten dürfen. Die Natriumkonzentration in den Zellen wird dann, getrieben von der Pumpe, von Schicht zu Schicht ansteigen. Ob man unter diesen Umständen die äußere Diffusionsschranke noch als morphologische Einheit ansprechen kann, bleibt zunächst fraglich.

II. Wo entsteht der Spike?

Der größte Teil des epithelialen Gesamtwiderstandes wurde bei unseren Versuchen in der alleräußersten Zellmembran gefunden. Nur etwa 10- bis 50 Prozent verblieben zwischen der Mikroelektrode, deren Spitze sich in einer Zelle der obersten Schicht befand, und der inneren Referenzelektrode (Abb.6).

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Meinung anderer Autoren, nach der die Membran mit dem Hauptwiderstand von der Außenlösung getrennt sei durch eine Lage toter, verhornter Zellen (22).

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wo der Hauptwiderstand tatsächlich zwischen der ersten und zweiten Zellschicht lokalisiert war (man kann vermuten, daß diese Frösche kurz vor der Häutung standen), zeigten unsere Versuche, daß die äußere Membran der 'toten', verhornten Zellen den größten Teil des Widerstandes der Haut birgt.

Allerdings wäre es denkbar, daß die Mikroelektrode nicht eine Membran mit großem Widerstand durchbohrt, sondern einen noch vor ihr liegenden (z.B. durch mechanischen Druck) zerstört bzw. geschädigt hat. Dann könnte man wohl im Prinzip Bilder wie Abb. 6 erhalten, jedoch würde eine Erniedrigung des Widerstandes einer vor der Mikroelektrodenspitze liegenden Membran dazu führen, daß mehr Strom durch diese Stelle fließt; eingedenk des Ohmschen Gesetzes wird man also nicht erwarten, daß Spur 3 so tief verläuft, wie Abb. 6 es zeigt.

Der folgende Versuch schließt die Möglichkeit, daß die Elektrode einen tiefer im Epithel gelegenen Widerstand zerstört, eindeutig aus (Abb.12).

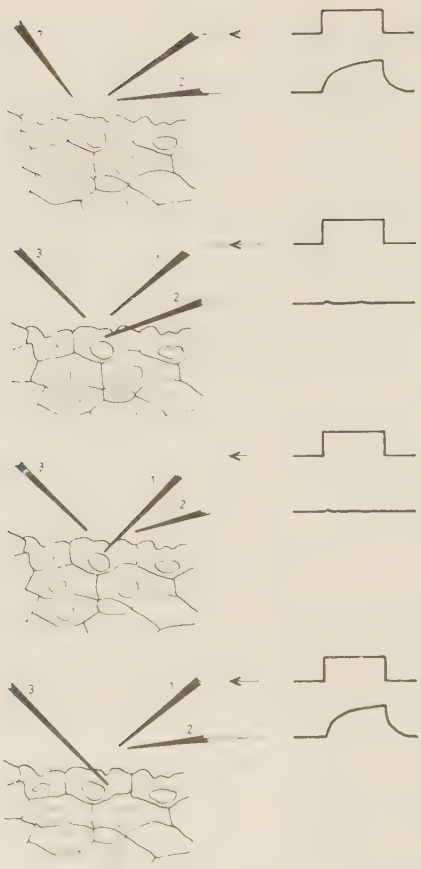



Abb.12 Lokalisation des Hauptwiderstandes

Elektrode 1 dient als punktförmige Stromquelle, Elektrode 2 registriert das lokale Potential an ihrer Spitze, Elektrode 3 ist nicht mit der Anlage verbunden. Wenn alle drei Mikroelektroden sich über der Haut in der Außenlösung befinden, erscheint in 2 der Potentialverlauf, den der Stromimpuls von 1 über den gesamten Widerständen des Gewebes entwickelt. Wird eine der beiden Elektroden 1 oder 2 in eine Zelle der obersten Schicht eingestochen, verschwindet das Potentialsignal. Nicht aber dann, wenn die Elektroden 1 und 2 in der Außenlösung bleiben und lediglich die Elektrode 3 die alleräußerste Zellmembran penetriert.

Über dem Epithel in der Außenlösung befinden sich drei Mikroelektroden. Die Spitze von Elektrode 1 dient als punktförmige Stromquelle (Rechteckimpulse, $10^{-7}$ Amp, 5 msec Dauer), Elektrode 2 registriert das lokale Potential gegen die innere Referenzelektrode (nicht eingezeichnet) und Elektrode 3 schließlich ist nicht mit der Anlage verbunden. Zunächst fängt Elektrode 2 das Potentialsignal auf, das der Stromimpuls von Elektrode 1 über den Widerstand der ganzen Haut entwickelt. Wird die zweite Elektrode jetzt durch die äußere Zellmembran in eine Zelle der oberen Schicht getrieben, beträgt die Amplitude des von ihr jetzt registrierten Signals nur noch weniger als 5 Prozent der vorherigen.

Das gleiche passiert, wenn Elektrode 1 eingestochen wird und Elektrode 2 in der Außenlösung verbleibt.

Die auffallende Verkleinerung der Amplitude beruht nun offenbar auf einem Abfall des Widerstandes, über dem das Potential entsteht, wenn eine der beiden Elektroden eingestochen wird; entweder weil sie eine Membran mit großem Widerstand durchstoßen oder weil sie einen noch vor ihnen liegenden großen Widerstand beschädigt haben. Wenn letzteres stimmt, müßte das Signal der Elektrode 2 auch dann verschwinden, wenn Elektrode 3 in die Zelle eingeführt wird. Das ist aber nicht der Fall.

Der Hauptwiderstand des Froschhautepithels liegt folglich in der alleräußersten Zellmembran.

Die Froschhaut zeigt bei galvanostatischer Reizung einen Spike, weil sie einen variablen, potentialabhängigen Widerstand besitzt. Man muß vermuten, daß der große Widerstand der äußeren Zellmembran an der Entstehung der schnellen Potentialschwankung beteiligt ist.

Die Ergebnisse bestätigen diese Vermutung (Abb.7). Der Spike erscheint in der Potentialdifferenz zwischen Mikroelektrode und Außenlösung (v), nicht jedoch zwischen Mikroelektrode und Innenlösung (V-v) (Mikroelektrodenspitze in einer Zelle der obersten Schicht). Ist daraus ein sicherer Schluß auf den Ort der Entstehung des Spikes möglich?

Abb. 13B zeigt ein Ersatzschaltbild der Widerstandsverhältnisse: $r_1$ und $r_3$ sind die äußeren Membranen zweier benachbarter Zellen der obersten, verhornten Lage; $r_4$ entspricht einer zonula occludens; $r_2$ und $r_5$ repräsentieren die Widerstände der tieferen Gewebeschichten. Gemessen wird die Potentialdifferenz V zwischen Außenseite und Masse (Innenseits) und die Potentialdifferenz v über der äußeren Zellmembran.

In der Mikroelektrodenspur (v) wird nun eine schnelle Potentialschwankung erscheinen, wenn sie entweder auf einer Änderung des Widerstandes $r_1$ beruht (was behauptet wird), oder aber wenn der Spike in $r_5$ entsteht. Falls nämlich $r_4$ sehr groß ist, wird eine Widerstandsänderung von $r_5$ einen mehr bzw. weniger großen Teil des konstanten Gesamtstromes durch den parallelen Zweig $r_1 + r_2$ treiben: die Schwankung von $r_5$ wird in v reflektiert.

Die Spikeamplitude wird nun in v kleiner sein als in V, weil der rechte Teil des Schaltbildes als Spannungsteiler arbeitet. Da die Widerstände und damit auch das Spannungsteilerverhältnis potentialunabhängig sein sollen, gilt das gleiche auch für unterschwellige Impulse.

Falls $r_4$ klein ist, wird das Verhältnis der Spikeamplituden v/V kleiner sein als das Verhältnis der Amplituden unterschwelliger Impulse in v und V, weil ein Teil des Stromes über $r_4$ unter

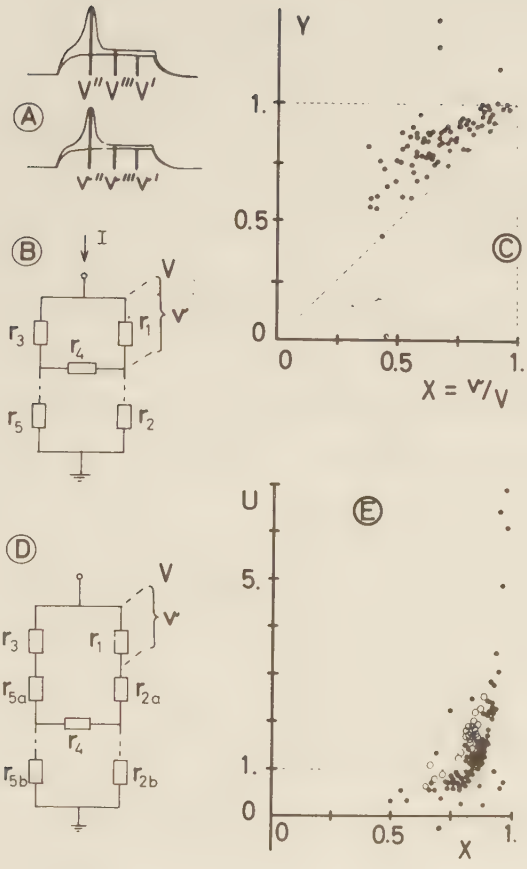



Abb.13 Die Lokalisation der schnellen Potentialschwankung

A : Registriert wird der Potentialverlauf über der gesamten Haut (V) und über der alleräußersten Zellmembran (v), jeweils für einen unterschwelligen (I') und einen überschwelligen Stromimpuls (I'').

B : $r_1$ und $r_3$ sind die alleräußersten Zellmembranen zweier benachbarter Zellen; $r_4$ ist die sie verbindende zonula occludens; $r_2$ und $r_5$ sind die tieferen Gewebewiderstände.

(Fortsetzung der Legende zu Abb.13 :)

C : Das Verhältnis der Spikeamplituden $y = (v''-v')/(V''-V')$ ist aufgetragen gegen das Verhältnis der Amplituden eines unterschwelligen Impulses in V und v , nämlich $v'/V'$.

D : Das gleiche Schema wie B, nur die zonula occludens $r_4$ liegt eine Zellschicht tiefer. $r_{5a}$ und $r_{2a}$ entsprechen also den Membranen zwischen erster und zweiter Zellschicht.

E : $U = (\frac{V'}{I'} - \frac{V'''}{I''}) \cdot I'/(V' - v')$. U größer als eins bedeutet, daß der Widerstandsabfall unter den Ruhewert nach dem Spike größer ist als die Summe aller Widerstände unter der alleräußersten Zellmembran.

Die offenen Kreise in dieser Abbildung beziehen sich auf Versuche mit $Na^+$-freier Außenlösung.

Umgehung von $r_1$ (und natürlich $r_5$) gegen Masse abfließt. Ist $r_4$ schließlich null, wird eine Änderung von $r_5$ überhaupt nicht mehr in v erscheinen.

Danach genügt es offenbar, das Verhältnis der Amplituden unterschwelliger Impulse in v und V, $x = v'/V'$, gegen das Verhältnis der Spikeamplituden, $y = \frac{v'' - v'}{V'' - V'}$, aufzutragen, um zu entscheiden, ob der Spike in $r_1$ oder $r_5$ entsteht. Das ist in Abb. 13C für 98 Versuche geschehen.

Man sieht, daß das Verhältnis der Spikeamplituden, abgesehen von drei Fällen (vermutlich Meßfehler), immer kleiner als eins ist, bei sehr guten Penetrationen nahe bei eins liegt, bei schlechteren (mit größerem Leckwiderstand zwischen Mikroelektrodenschaft und Zellmembran) etwas über 0.5, wobei natürlich mit abnehmendem y auch x kleiner wird.

Immer aber (mit Ausnahme eines Wertepaares) ist das Verhältnis der Spikeamplituden y größer als das Verhältnis der Amplituden unterschwelliger Impulse: alle Punkte liegen oberhalb der Geraden $y = x$.

Damit kann $r_5$ unmöglich Ursprung der schnellen Potentialschwankung sein. Sie muß oberhalb der ersten zonula occludens entstehen, die zwei Zellen der gleichen Schicht miteinander verbindet.

Vermutlich liegt diese zonula occludens in der obersten Lage verhornter Zellen, dicht unterhalb der alleräußersten Zellmembran. Sie könnte allerdings auch eine Schicht tiefer zu finden sein, so daß der Spike auch an der Membran zwischen erster und zweiter Zellschicht entstehen könnte ($r_{5a}$ in Abb. 13D).

Wie Abb. 1 zeigt, fällt der Widerstand des Epithels nach dem Spike unter den Ruhewert. Nun kann aber offensichtlich dieser

Widerstandsabfall nicht größer sein als der Widerstand selbst. In Abb. 13E ist U der Quotient aus Widerstandsabfall nach dem Spike und Widerstand zwischen Mikroelektrode und innerer Referenzelektrode. U größer als 1 heißt, daß der Widerstandsabfall größer ist als die Summe aller Widerstände unter der äußeren Zellmembran (eingeschlossen $r_{5a}$).

Die Abbildung zeigt, daß dies in 79 von 124 Penetrationen der Fall war. Viel weniger würden schon genügen, um $r_{5a}$ als Ort der Entstehung des Spikes auszuschließen.

Aus den geschilderten Ergebnissen und ihrer kritischen Betrachtung muß zwangsläufig gefolgert werden, daß

1. die alleräußerste Zellmembran den Hauptwiderstand des Epithels ausmacht und daß
2. die alleräußerste Zellmembran unter bestimmten Bedingungen zu blitzschnellen Änderungen ihrer Permeabilität fähig, d.h. erregbar ist[1) 2)].

Diese Resultate passen in unsere Vorstellungen vom funktionellen Aufbau der Froschhaut.

---

1) Dabei muß nicht vorausgesetzt werden, daß die penetrierte Membran noch erregbar ist. Eine Widerstandsänderung großer Teile der oberflächlichen Zellmembranen wird sich im Stromfluß durch die evtl. beschädigte Membran spiegeln und die erhaltenen Registrierungen geben.

2) Ob auch andere Membranen des Epithels einen Spike produzieren können, bleibt ungewiß. Vielleicht besitzen sie diese Fähigkeit, können sie nur nicht ausnutzen, da sie durch zonulae occludentes und interzelluläre Spalträume kurzgeschlossen sind; vielleicht aber auch erwerben sie diese Eigenschaft erst im Laufe ihres Lebens.

Die äußere Diffusionsschranke muß einen großen Widerstand besitzen, da sie den Durchtritt von Ionen in hohem Maße hemmt. Diese Eigenschaft muß aufgrund unserer Versuche der alleräußersten Zellmembran zugeschrieben werden. Wahrscheinlich haben auch die äußeren Membranen tiefer im Epithel gelegener Zellen Funktionen der äußeren Diffusionsschranke, nur bleibt ihr Gesamtwiderstand klein, da die Kontinuität ihrer Oberfläche durch interzelluläre Kanäle unterbrochen wird.

Besondere Bedeutung kommt jetzt den verhornten Zellen des str.corneum zu. Ein passiver Eintritt von Natrium in die Zelle durch die äußere Diffusionsschranke erfordert eine niedrige $Na^+$-Innenkonzentration. Vielleicht sind gerade diese Zellen, die nur noch kurze Zeit zu funktionieren brauchen, befähigt, mit Spuren von Natrium im Protoplasma auszukommen.

Dann wären die verhornten, 'toten' Zellen der beiden äußeren Lagen nicht nur Ballast oder mechanischer Schutz, sondern unersetzlicher Bestandteil des Transportsystems der Froschhaut.

III. Der Widerstandsabfall nach Digitonin

Mit großer Wahrscheinlichkeit entspricht die Lipoidphase im Membranmodell von Danielli und Davson (7) der äußeren homogenen Schranke in Ussings Zwei-Barrieren-Hypothese. Die innere, poröse Barriere müßte der unter der Lipoidlamelle liegenden Proteinschicht zugeordnet werden.

Es besteht Grund zu der Annahme, daß die Lipoidschicht der meisten biologischen Membranen zum größten Teil aus Phospholipiden mit dazwischen liegenden Cholesterinmolekülen besteht (Abb.14 re.Teil)[1].

Mit Digitonin kann man auf einfache Weise Eingriffe in die Membranstruktur vornehmen. Digitonin ist ein Pentaglykosid des Digitogenins und bildet mit freiem Cholesterin Komplexe im Verhältnis 1 : 1 (55).

Digitonin löst Cholesterin aus der Erythrozytenmembran heraus und verursacht dadurch, nach geringem $K^+$-Verlust, Hämolyse (46). In unseren Experimenten an der Froschhaut bewirkt Digitonin in Konzentrationen von 0.04-0.2 mM/l einen schnellen Abfall sowohl des $Na^+$- als auch des $K^+$-Widerstandes. Die Membran kann nach Digitonin nicht mehr zwischen diesen Ionenspecies unterscheiden.

Registrierungen mit Mikroelektroden zeigen, daß der Widerstand der alleräußersten Zellmembran so klein wird, daß er nicht mehr gemessen werden kann (Abb.8). Daß dann kein Spike mehr

---

1) Verschiedene Untersucher finden für die Zusammensetzung der Lipide von Erythrozytenghosts:

| | | |
|---|---|---|
| Phospholipid ..... | 59-65 | |
| Cholesterin (unverestert)..... | 23-29 | (41) |

auszulösen ist, erscheint nicht verwunderlich. Deshalb kann auch nicht entschieden werden, ob Digitonin einen direkten Einfluß auf den Mechanismus der schnellen Potentialschwankung hat.

Die Befunde lassen sich zwanglos erklären durch eine Verbindung von Digitonin mit Cholesterin; wobei das Cholesterin aus dem Membranzusammenhang herausgelöst wird (46).

Auffallend ist, daß nach Auswaschen des Digitonins in relativ kurzer Zeit (oft innerhalb weniger Minuten) der Widerstand der alleräußersten Zellmembran von Null auf seinen alten Wert zurückkehrt.

Die ursprüngliche Membranstruktur muß also wiederhergestellt worden sein. Das könnte entweder geschehen durch

a) de novo Synthese von Cholesterin,

b) Ersatz des verlorengegangenen Cholesterins durch Cholesterinmoleküle, die bereits in der Zelle vorhanden sind, oder

c) Austausch der beschädigten Membranabschnitte gegen Membranen von Zellorganellen (z.B. endoplasmatisches Reticulum) nach dem Mechanismus des 'membrane flow', wie er zuerst von Bennett diskutiert worden ist (2).

Von welcher Möglichkeit die Froschhaut auch Gebrauch macht (was hier nicht entschieden werden kann), die Fähigkeit der äußeren Zellmembran des str.corneum ihre Struktur wiederherzustellen ist beachtenswert.

Ein anderer Weg, die Wirkung von Digitonin zu erklären, soll noch erwähnt werden: eine Doppelschicht-Mizellen-Umwandlung der Lipoidphase.

Lucy (39) nimmt zwei Membranzustände an. Der eine entspricht dem herkömmlichen Davson-Danielli-Modell, der andere unterscheidet

Abb.14 Membranmodell

Die Lipidphase in einer natürlichen Membran kommt in zwei Zuständen vor; einmal als bimolekulare Schicht und dann in Form globulärer Mizellen. Zwischen beiden Konfigurationen besteht ein Gleichgewicht, das durch verschiedene Eingriffe zur einen oder zur anderen Seite verschoben werden kann. Die in einem hexagonalen Gitter angeordneten Mizellen brauchen nicht unbedingt nur aus Lipoiden zu bestehen, sondern sie könnten auch Proteine enthalten, die u.U. sogar Enzymcharakter tragen.
Links: 2 Proteinmizellen ; Mitte : Lipoidmizelle ;
Rechts: bimolekulare Lipoidschicht.
Cholesterin :
Phospholipide :
Membraneiweiß :

(umgezeichnet nach Lucy (39))

sich von diesem dadurch, daß die Lipoide in globulären Mizellen angeordnet sind (Abb.14, li.Teil).

Die Lipoidkugeln liegen in einem hexagonalen Gitter und lassen zwischen sich Protein-gefüllte Kanäle mit einem Radius von 4.2 Å frei. Allerdings ist der Durchmesser dieser Poren nicht konstant. Er hängt ab von der Größe der Mizellen und den Kräften, die zwischen benachbarten Mizellen und den Proteinen wirken. Außerdem sollen sich die Mizellen in thermischer Bewegung befinden. Nicht alle Mizellen brauchten Lipoidcharakter zu haben, sondern einige würden auch aus Eiweißen bestehen, die sogar Enzymaktivität besitzen könnten.

Es ist einleuchtend, daß dieses Modell genau so wenig die Eigenschaften biologischer Membranen beschreiben kann, wie die 'unit membrane': seine Permeabilität würde viel zu hoch sein. Lucy glaubt daher, daß beide Zustände in einer Membran vorkommen und daß sie in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen.

Eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Mizellen würde die Durchlässigkeit der Membran erhöhen, eine Verschiebung zur Doppelschicht sie erniedrigen. Spezifität kann leicht erreicht werden durch unterschiedliche Porengröße und die Ladungen der polaren Gruppen, welche an den Oberflächen der Mizellen die Proteinkanäle säumen.

Obwohl Lucy einige Hinweise dafür geben kann, daß sein Modell nicht völlig absurd ist, bleibt es doch in höchstem Grade hypothetisch. Aber es besticht durch seine große Versatilität. Man hat kaum Schwierigkeiten sich vorzustellen, wie Mizellen sich in einem elektrischen Feld drehen nach Maßgabe der Ladungen an ihren Oberflächen, dabei die Ladungsverteilung entlang einer Pore ändern

und dadurch diese Pore für eine bestimmte Ionensorte schließen oder öffnen.

Die Wirkung von Digitonin läßt sich an diesem Modell folgendermaßen erklären.

Wenn Digitonin sich mit dem nicht-veresterten Cholesterin verbindet, wird die lipoide Doppelschicht unstabil[1].

Mizellen (und Poren) werden gebildet, die Permeabilität steigt, der Widerstand sinkt. Nach Auswaschen des Digitonins stellt sich das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen lamellärer und globulärer Struktur wieder ein: der Effekt ist reversibel. Voraussetzung ist allerdings, daß das Digitonid in der Membran weniger stabil ist als im Reagenzglas.

Gegen diese Hypothese scheinen Befunde zu sprechen, die an Erythrozyten, Viren und Leberzellen erhoben worden sind (9). Wenn man deren Membranen mit Saponin inkubiert, erscheinen Löcher mit einem Durchmesser von etwa 85 Å, die in einem hexagonalen Gitter angeordnet sind. Die Veränderungen bleiben aus, wenn die Membranen vorher mit Digitonin behandelt worden waren; Digitonin allein hatte keine Wirkung. Die Konzentrationen sind von der gleichen Größenordnung wie die von uns an der Froschhaut verwendeten. Allerdings ist die Interpretation der siebähnlichen Membranstruktur auf der elektronenoptischen Aufnahme schwierig. Es scheint auch noch nicht klar zu sein, welche Strukturen Proteinen und welche Lipoiden entsprechen (39).

---

1) Haydon u.Taylor haben gefunden, daß bimolekulare Lipidfilme instabil werden, wenn die Zahl der in ihnen enthaltenen Nicht-Phospholipid-Moleküle zu groß wird (17).

Vorher aber ist es müßig die Frage zu prüfen, ob diese Befunde einen Lamellen-Mizellen-Übergang der Lipoidphase unter Digitonin ausschließen.

Wenn das der Fall sein sollte, die Erholung der alleräußersten Membran also nur unter wesentlicher Beteiligung ihrer Zelle stattfinden kann, wäre dies ein starker Hinweis darauf, daß die Zellen des str.corneum nicht 'tot' sind, daß sie mehr von ihrer ursprünglichen Aktivität bewahrt haben, als bisher angenommen wurde.

## IV. Die schnelle Potentialschwankung unter Amphotericin B

Amphotericin B ist ein Antibioticum aus der Gruppe der Polyene mit einem Molekulargewicht von etwa 950. Es enthält einen großen Ring mit sieben Doppelbindungen (Hepten), eine Amino- und eine Carboxylgruppe.

Eine ganze Reihe von Daten läßt es fast als sicher erscheinen, daß Amphotericin B mit Sterolen in der Membran reagiert (8, 24, 25, 26, 31, 32). Es war daher interessant zu erfahren, ob Amphotericin B einen Einfluß hat auf die Eigenschaften der homogenen Barriere der äußeren Diffusionsschranke oder anders ausgedrückt, ob Amphotericin B eine Wirkung auf den Ablauf der schnellen Potentialschwankung erkennen läßt und es damit ermöglicht, den Ort der Entstehung des Spikes weiter zu spezifizieren. Wie bereits ausführlich dargelegt, ist dies der Fall.

Wenn ein Stromimpuls genügend hoher Amplitude eine genügend große Potentialdifferenz über der äußeren Zellmembran in der richtigen Richtung (Außenseite positiv) erzeugt, schließt sich der $Na^+$-Kanal. Der Widerstand steigt und damit (bei konstantem Strom) auch das Potential: Anstiegsflanke des Spikes.

Der Spike ist nun gekennzeichnet durch einen zweiten kritischen Potentialwert, der im allgemeinen 200 mV höher liegt als das Schwellenpotential, nämlich dem Spitzenpotential, bei dem sich der unspezifische Leckkanal öffnet: Abfallflanke des Spikes. Häufig verläuft dieser Abfall vom Spitzenpotential biphasisch, wie auch in Abb. 9 (oben) angedeutet, zunächst mit kleinerer, dann mit größerer negativer Steigung, so daß eine Schulter ausgebildet wird. Wenn auch die Kinetik im einzelnen unbekannt ist, so ist es doch wahrscheinlich, daß zwei Vorgänge an der Abfallflanke beteiligt sind:

das Öffnen des Leckkanals und (nachdem das Potential wieder gefallen ist) das neuerliche Aufgehen des $Na^+$-Kanals. Der Leckkanal bleibt noch lange nach dem Spike offen und schließt sich erst langsam wieder, so daß der Gleichstromwiderstand der Haut erniedrigt und sie daher zunächst nicht mehr erregbar, also refraktär ist.

Amphotericin B, in Konzentrationen von 0.03-0.06 mM/l der Außenlösung zugesetzt, verändert die Form der schnellen Potentialschwankung in ganz charakteristischer Weise: Das Spitzenpotential ist erniedrigt; die erste, langsame Phase der Abfallflanke wird noch langsamer und entsprechend länger; der Widerstand bleibt nach dem Spike höher als gewöhnlich (Abb.9).

Die Resultate lassen sich interpretieren als eine Einwirkung der Substanz auf den Leckkanal. Er öffnet sich sehr langsam und unvollständig bei einem niedrigeren Potential. Nicht nur die Zeitkonstante des Vorgangs wird beeinflußt sondern auch die Endstellungen.

Daß tatsächlich, zumindest in erster Linie, der Leckkanal betroffen ist, zeigt Abb. 10. In $Na^+$-freier Außenlösung kann das Schließen des Natrium-Kanals nicht bemerkt werden, ein schneller Potentialanstieg fehlt. Wohl aber geht bei entsprechend hohen Potentialen der Leckkanal auf: verzögerte Gleichrichtung. Das Verhalten des Leckkanals wird hier von Amphotericin B in ähnlicher Weise verändert wie beim Spike.

Bedeutsam ist, daß alle Effekte nur in Anwesenheit von $Cl^-$ zu finden sind, nicht aber wenn Sulfat oder Glukonat als Anionen dienen. Das weist darauf hin, daß penetrierende Anionen für die Wirkung von Amphotericin B notwendig sind. Einen Anhaltspunkt für eine Erklärung dieses merkwürdigen Verhaltens liefern die Daten zur Zeit nicht.

Hinweise für einen komplexen Wirkungsmechanismus des Amphotericins B finden sich in der Literatur.

Während Lichtenstein und Leaf (37) gefunden haben, daß das Antibioticum an der Krötenblase die Flüsse von Natrium, Kalium, Chlor, Harnstoff und Thioharnstoff, welche die homogene Barriere der äußeren Diffusionsschranke normalerweise nur mehr oder weniger schwer passieren können, stark erhöht, nicht aber den Wasserfluß, der von der porösen Barriere begrenzt wird, finden jetzt Mendoza, Handler und Orloff an dem nämlichen Epithel (42) einen Anstieg der Wasserpermeabilität.

Lichtenstein und Leaf schlossen auf einen Angriffspunkt an der äußeren, homogenen Barriere, Mendoza et al. müssen folgern, daß Amphotericin B wenigstens auch auf die innere, poröse Barriere wirkt.1)

Während Lichtenstein und Leaf über einen erhöhten Kurzschlußstrom (bedingt durch eine Steigerung des $Na^+$-Transports) berichteten, ist in unseren Versuchen, die im Abschnitt 'Ergebnisse' beschrieben wurden, nie ein deutlicher Abfall des Widerstandes eingetreten, obwohl die verwendeten Amphotericin B - Konzentrationen bis zu 1o x höher waren.

Mendoza et al. finden einen erhöhten $Na^+$- Transport nach Amphotericin B erst dann, wenn sie die Krötenblasen vorher 12 Stunden

---

1) Nach jüngsten Messungen von Hays an einer künstlichen '2-Barrieren-Membran' (18) wird der Wasserdiffusionsfluß ($J_D$) von der porösen Barriere begrenzt, während der osmotische Wasserfluß ($J_V$) seinen Hauptwiderstand in der homogenen Barriere findet. Nach $J_V = J_D \, RT \cdot r^2/8 \eta D$ (r = äquivalenter Porenradius) könnte $J_V$ nicht nur durch Vergrößerung von r sondern auch durch einen Anstieg des Wasserdiffusionsflusses durch die homogene Barriere anwachsen.

lang in Glukose-haltigen Medien inkubieren.

In monomolekularen Lipidfilmen führt der Zusatz von Polyen-Antibiotica zu einer beträchtlichen Steigerung des Filmdrucks. Dabei genügt es offenbar, daß ein Molekül mit einem von 25o Steroidmolekülen reagiert (8, 26).

Relativ kleine Mengen Amphotericin B werden demnach genügen, relativ große Veränderungen der Membranstruktur hervorzurufen; in welcher Weise ist vorerst noch unklar und wird in späteren Arbeiten untersucht werden müssen.

## Zusammenfassung

Die Untersuchung der alleräußersten Zellmembran mit Hilfe der Mikroelektrodentechnik brachte folgende Resultate :

1 5o - 9o Prozent des Widerstandes der Froschhaut sind in der alleräußersten Zellmembran lokalisiert.

2 Die schnelle Potentialschwankung entsteht an der alleräußersten Zellmembran.

3 Digitonin senkt den Widerstand der alleräußersten Zellmembran reversibel auf null.

4 Amphotericin B beeinflußt reversibel in charakteristischer Weise die Form der schnellen Potentialschwankung :
das Spitzenpotential wird gesenkt,
die 'Schulter' herausgehoben,
der Widerstandsabfall nach dem Spike vermindert.
Die Effekte sind gebunden an die Anwesenheit von Cl'.

Die Bedeutung der Befunde für unser Verständnis der Permeabilitätseigenschaften des Froschhautepithels wird diskutiert.

## Literaturverzeichnis


1. Andersen,B. u. H.H.Ussing
Acta Physiol.Scand.39,236(1957)

2. Bennett,H.S.
J.Biochem.Biophys.Cyt.Suppl.2,99(1956)

3. Bennett,H.S.
J.Histochem.Cytochem.11,14(1963)

4. Biber,Th.U.L. , R.A.Chez u. P.F.Curran
J.Gen.Physiol.49,1161(1966)

5. Cereijido,M. u. P.F.Curran
The Physiologist 7,1o1(1964)

6. Curran,P.F. , F.C.Herrera u. W.J.Flanigan
J.Gen.Physiol.46,1o11(1963)

7. Danielli,J.F. u. H.Davson
J.Cell.Comp.Physiol.5,495(1935)

8. Demel,R.A. , L.L.M.van Deenen u. St.C.Kinsky
J.Biol.Chem.24o,2749(1965)

9. Dourmashkin,R.R. , R.M.Dougherty u. R.J.C.Harris
Nature 194,1116(1962)

1o. du Bois-Reymond,E.
Untersuchungen über thierische Electricität
2.Bd.,2.Abth.,Berlin 186o

11. Engbaek,L. u. T.Hoshiko
Acta Physiol.Scand.39,348(1957)

12. Farquhar,M.G. , S.L.Wissig u. G.E.Palade
J.Exper.Med.113,47(1961)

13. Farquhar,M.G. u. G.E.Palade
Proc.Nat.Acad.Sci.51,569(1964)

14. Finkelstein,A.
Nature 19o,1119(1961)

15. Finkelstein,A.
J.Gen.Physiol.47,545(1964)

16. Gildemeister,M.
Pflügers Arch.Ges.Physiol.149,389(1913)

17. Haydon,D.A. u. J.Taylor
J.Theor.Biol.4,281(1963)

18. Hays,R.M.
J.Gen.Physiol.50,2509(1967)

19. Herrera,F.C. , G.Whittembury u. A.Planchart
Biochim.Biophys.Acta 66,170(1963)

20. Herrera,F.C. u. P.F.Curran
J.Gen.Physiol.46,999(1963)

21. Herrera,F.C.
Amer.J.Physiol.209,819(1965)

22. Hoshiko,T.
In:Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions
S.46 , Amer.Ass.Adv.Sci. , Washington 1961

23. Imamura,A. , H.Takeda u. N.Sasaki
J.Cell.Comp.Physiol.66,221(1965)

24. Kinsky,St.C. , J.Avruch , M.Permutt , H.B.Rogers
u. A.A.Schonder
Biochem.Biophys.Res.Comm.9,503(1962)

25. Kinsky,St.C.
Arch.Biochem.Biophys.102,180(1963)

26. Kinsky,St.C. , S.A.Luse u. L.L.M.van Deenen
Fed.Proc.25,1503(1966)

27. Koefoed-Johnsen,V. u. H.H.Ussing
Acta Physiol.Scand.42,298(1958)

28. Kurtz,S.M.
Lab.Invest.10,1189(1961)

29. Kurtz,S.M. u. J.D.Feldman
J.Ultrastruc.Res.6,19(1962)

30. Kutschera,J.
Diss.Frankfurt(Main) 1967

31. Lampen,J.O. , P.M.Arnow u. R.S.Safferman
J.Bact.80,200(1960)

32. Lampen,J.O. , P.M.Arnow , Z.Borowska u. A.I.Laskin
J.Bact.84,1152(1962)

33. Leaf,A. u. A.Renshaw
Biochem.J.65,82(1957)

34. Leaf,A. , L.B.Page u. J.Anderson
J.Biol.Chem.234,1625(1959)

35. Leaf,A. u. R.M.Hays
J.Gen.Physiol.45,921(1962)

36. Lettwin,J.Y. , B.Howland u. R.C.Gesteland
IRE Trans.on Med.Electronics PGME 10,26(1958)

37. Lichtenstein,N.S. u. A.Leaf
J.Clin.Invest.44,1328(1965)

38. Loewenstein,W.R. , M.Nakas u. S.J.Sokolar
J.Gen.Physiol.5o,1865(1967)

39. Lucy,J.A.
J.Theor.Biol.7,36o(1964)

4o. Mac Robbie,E.A.C. u.H.H.Ussing
Acta Physiol.Scand.53,348(1961)

41. Maddy,A.H.
Intern.Rev.Cytol.2o,1(1966)

42. Mendoza,St.A. , J.S.Handler u. J.Orloff
Amer.J.Physiol.213,1263(1967)

43. Noble,K.G.
The Biology of the Amphibia , S.139
Dover Publications , New York 1954

44. Ottosen,D. , F.Sjöstrand , S.Stenström u. G.Svaetichin
Acta Physiol.Scand.29,611(1953)

45. Parakkal,P.F. u. A.G.Matoltsy
J.Cell.Biol.2o,85(1964)

46. Passow,H.
In:Ch.Bishop u. D.M.Surgenor (Hrsgb.) , The Red Blood Cell
Acad.Press , New York u. London 1964

47. Rotunno,C.A, , V.Kowalewski u. M.Cereijido
Biochim.Biophys.Acta 135,17o(1967)

48. Scheer,B.T. u. M.W.Mumbach
J.Cell.Comp.Physiol.55,259(196o)

49. Schmidt u. Skou
persönliche Mitteilung an Dr.Lindemann (1962)

5o. Snell,F.M. u. T.K.Chowdhury
The Physiologist 7,1o3(1967) , (Zusammenfassung)

51. Ussing,H.H. u. K.Zerahn
Acta Physiol.Scand.23,11o(1951)

52. Ussing,H.H. u. E.E.Windhager
Acta Physiol.Scand.61,484(1964)

53. Ussing,H.H.
Ann.N.Y.Acad.Sci.137,543(1966)

54. Whittembury,G.
J.Gen.Physiol.47,795(1964)

55. Windaus,A.
Ber.Dtsch.Chem.Ges.42,238(19o9)

56. Zerahn,K.
Acta Physiol.Scand.36,300(1956)

# L e b e n s l a u f

Ich wurde am 10.9.1938 als Sohn des Ingenieurs Hans Thorns und seiner Ehefrau Elfriede in Hamburg geboren.

Von 1944 bis 1951 besuchte ich verschiedene Volksschulen in meiner Heimatstadt und anschließend das Gymnasium für Jungen in Harburg.

Im März 1958 bestand ich das Abitur.

Ich begann ein Medizinstudium in Hamburg, wo ich auch am 28.September 1964 das Staatsexamen ablegte.

Vom 1.10.1964 bis zum 31.7.1965 arbeitete ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof.Dr.G.Malorny).

Seit dem 1.8.1965 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am II.Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes unter Prof. Dr.H. Passow tätig.

ROTAPRINT-OFFSETDRUCKEREI

Klein

6602 Dudweiler · Scheidter Straße 26
Telefon Sulzbach 7 32 84
Drucksachen aller Art · Fotokopien
Spezialgebiet: Druck v. Dissertationen